

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-273421

(43)Date of publication of application : 30.09.1994

(51)Int.Cl.

G01N 33/579

C12Q 1/37

(21)Application number : 06-019915

(71)Applicant : WAKO PURE CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 20.01.1994

(72)Inventor : TSUCHIYA MASAKAZU  
HARADA KAZUAKI

(30)Priority

Priority number : 05 26159 Priority date : 21.01.1993 Priority country : JP

(54) METHOD FOR SUPPRESSING FOR ACTIVITY OF ENDOTOXIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide the selective suppressing method for endotoxin (hereinafter ET), which can be performed by a simple operation by using reagent that can be obtained readily and the method and reagent for measuring the material having the ET activity contained in a sample other than ET (hereinafter described as ET-analogous material) by using the above described method.

CONSTITUTION: In a sample containing endotoxin, a peptide derivative (or protein) having the property for suppressing the activity of ET in combination with ET and a surface-active agent are commonly present. This method has the above described feature. This is the method for suppressing the activity of ET and also the measuring method for the ET-analogous material contained in the sample, which is processed by the suppressing method.

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-273421

(43)公開日 平成 6 年(1994) 9 月30日

| (51)Int.Cl. <sup>5</sup> | 識別記号 | 庁内整理番号   | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------|------|----------|-----|--------|
| G 0 1 N 33/579           |      | 8310-2 J |     |        |
| C 1 2 Q 1/37             |      | 6807-4 B |     |        |

審査請求 未請求 発明の数17 F D (全 13 頁)

|             |                     |         |  |
|-------------|---------------------|---------|--|
| (21)出願番号    | 特願平6-19915          | (71)出願人 | 000252300<br>和光純薬工業株式会社<br>大阪府大阪市中央区道修町 3 丁目 1 番 2 号 |
| (22)出願日     | 平成 6 年(1994) 1 月20日 | (72)発明者 | 土谷 正和<br>兵庫県尼崎市高田町 6 番 1 号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内          |
| (31)優先権主張番号 | 特願平5-26159          | (72)発明者 | 原田 和明<br>兵庫県尼崎市高田町 6 番 1 号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内          |
| (32)優先日     | 平 5 (1993) 1 月21日   |         |  |
| (33)優先権主張国  | 日本 (J P)            |         |  |

(54)【発明の名称】 エンドトキシンの活性抑制方法

(57)【要約】

【目的】容易に入手できる試薬を用いて、簡便な操作により実施可能なエンドトキシン（以下、E T と略記する。）活性の選択的な抑制方法、及びこのような方法を用いて、試料中に含まれる E T 活性を有する物質であつて E T 以外のもの（以下、E T 類縁物質と略記する。）を測定する方法及びそのための試薬の提供。

【構成】エンドトキシンを含む試料に、E T と結合して E T の活性を抑制する性質を有するペプチド誘導体（又は蛋白質）と界面活性剤とを共存させることを特徴とする、E T の活性抑制方法、並びにこの方法により処理を行った試料中に含まれる E T 類縁物質の測定方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】エンドトキシンを含む試料に、エンドトキシンと結合してエンドトキシンの活性を抑制する性質を有するペプチド誘導体（又は蛋白質）（以下、エンドトキシン抑制ペプチドと略記する。）と界面活性剤とを共存させることを特徴とする、エンドトキシンの活性抑制方法。

【請求項2】加熱処理を併用する、請求項1に記載の抑制方法。

【請求項3】エンドトキシン抑制ペプチド及び界面活性剤を共存させた後に、該試料を加熱処理する、請求項1又は2に記載の抑制方法。

【請求項4】界面活性剤の濃度が0.005～5.0w/v%であり、エンドトキシン抑制ペプチド等の濃度が0.00001～0.1w/v%である、請求項1～3の何れかに記載の抑制方法。

【請求項5】加熱処理が、60～220℃で3～60分間加熱することである、請求項2～4の何れかに記載の抑制方法。

【請求項6】エンドトキシン抑制ペプチドがポリミキシンである、請求項1～5の何れかに記載の抑制方法。

【請求項7】界面活性剤が非イオン界面活性剤又は両性界面活性剤である、請求項1～6の何れかに記載の抑制方法。

【請求項8】請求項1に記載の方法により処理した試料を、カプトガニ血球成分液（以下、AL溶液と略記する。）と反応させ、その結果生ずる酵素活性化反応により活性化された酵素の活性を測定するか、又はその結果生ずるゲル化反応に基づく反応液の濁度の変化の程度やゲル化状態の程度を機器又は目視により測定することを特徴とする、試料中に存在する、AL溶液と反応して酵素活性化反応やゲル化反応を生じさせる性質を有する物質であってエンドトキシン以外のもの（以下、エンドトキシン類縁物質と略記する。）の測定方法。

【請求項9】エンドトキシン類縁物質が（1→3）-β-D-グルカン又は／及びその誘導体である、請求項8に記載の測定方法。

【請求項10】エンドトキシン抑制ペプチド及び界面活性剤を含む水溶液であって、AL溶液とは反応せず、且つAL溶液とエンドトキシン類縁物質との反応を阻害も促進もしないことを特徴とする、エンドトキシンの活性抑制用前処理液。

【請求項11】界面活性剤の濃度が0.01～10.0w/v%であり、エンドトキシン抑制ペプチドの濃度が0.00002～0.2w/v%である、請求項10に記載の前処理液。

【請求項12】エンドトキシン抑制ペプチドがポリミキシンである、請求項10又は11に記載の前処理液。

【請求項13】界面活性剤が非イオン界面活性剤又は両性界面活性剤である、請求項10～12の何れかに記載の前処理液。

【請求項14】エンドトキシン抑制ペプチド、界面活性剤及びAL溶液を含んでなる、エンドトキシン類縁物質の測定試薬。

【請求項15】エンドトキシン抑制ペプチドがポリミキシンである、請求項14に記載の測定試薬。

【請求項16】界面活性剤が非イオン界面活性剤又は両性界面活性剤である、請求項14又は15に記載の測定試薬。

【請求項17】エンドトキシン類縁物質が（1→3）-β-D-グルカン又は／及びその誘導体である、請求項14～16の何れかに記載の測定試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の利用分野】本発明は、エンドトキシン（以下、ETと略記する。）の有する、例えばカプトガニの血球成分液（以下、AL溶液と略記する。）と反応させると、該溶液に含まれるプロテアーゼ等の酵素を活性化させる反応（以下、単に酵素活性化反応と略記する。）やゲル化反応等を生起させる性質等（以下、ET活性と略記する。）を選択的に抑制する方法、並びにこの方法により処理を行った試料に含まれる、ET活性を有する物質（以下、AL溶液活性化物質と略記する。）であってET以外のもの（以下、ET類縁物質と略記する。）の測定方法に関する。

## 【0002】

【発明の背景】ETは、グラム陰性菌の細胞壁外膜に存在するリポ多糖（Lipopolysaccharide、LPS）であり、強い発熱性物質として知られている。このため、注射用医薬品等におけるETの検出は重要と考えられており、米国や日本の薬局方にもエンドトキシン試験法が収載されている。また、ETはグラム陰性菌感染症におけるショックの主な原因と考えられており、臨床診断上では、血漿中エンドトキシンの測定がグラム陰性菌感染症の診断、グラム陰性菌感染症の治療効果及び予後の判定、エンドトキシンショックの早期診断等に用いられている。AL溶液は、ETによって、酵素（プロテアーゼ等）の活性化反応やゲル化反応を生じる性質を有しており、医学、薬学、微生物学の分野ではこれを利用した、簡便で、安価なET検出法、例えば酵素（プロテアーゼ等）の活性化程度を比色法により測定することにより行う方法やゲル化反応を利用した所謂リムルステスト等（以下、これらを総称してリムルステスト等と略記する。）が、広く用いられている。

【0003】しかしながら、リムルステスト等に用いられる試薬は、ET類縁物質、例えば（1→3）-β-D-グルカンまたは／及びその誘導体（以下、βG等と略記する。）とも反応するため（Kakinuma et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 101, 434-439(1981); Morita et al., FEBS Lett., vol. 129, 318-321(1981)）、測定試料中にETと共にβG等が共存していた場合には、測

定値に正誤差が生じるという問題を有していた。

【0004】また、 $\beta$ G等は、ETを測定する場合には正誤差を与える妨害物質ではあるが、酵母やカビ等の真菌類の細胞壁成分でもあることから、AL溶液を用いて $\beta$ G等の検出を行えば、真菌感染症の診断に利用できると考えられるため、その測定法の開発も検討されている。しかしながら、現在市販されているリムルテスト等に用いられる試薬は当然のことながらETと反応するため、これらを用いて $\beta$ G等を測定しようとする場合は試料中のETによって測定値に影響を受けると言う問題があった。

【0005】このような問題点を解決するために、AL溶液を各種クロマトグラフィーにより処理してAL溶液中に存在するETと反応して酵素（プロテアーゼ等）の活性化反応やゲル化反応を生じさせる因子（以下、ET感受性因子と略記する。）を除去する方法（特開昭59-27828号公報、特開平2-138193号公報、特開平4-76459号公報）、或はETに対して親和性を持つペプチドをAL溶液に添加してET感受性因子を不活化する方法（特開平2-207098号公報）や、ET感受性因子に対する抗体をAL溶液に添加してET感受性因子を不活化する方法（特開平4-52558号公報）等が報告されている。しかしながら、これらの方法は、いずれもAL溶液自体に処理を施す方法であるため、通常環境に広く存在するETや $\beta$ G等によって該処理中にAL溶液が汚染される危険性が高いという欠点を有している。更には、これら方法は、このような汚染を回避するための無菌的設備や複雑な無菌的操作が必要であること、及び、ETに対して親和性を持つペプチドやET感受性因子に対する抗体は入手が困難であり高価であること等からも明らかなように、経済的、技術的にも問題の多い方法である。

【0006】また、AL溶液ではなく測定用試料を処理することによってETを不活化させる方法として、試料の加熱処理方法が報告されている（特開平2-141666号公報）。この方法は、上記の方法の欠点を克服しているものの、ETを十分に不活化するためには長い処理時間を必要とするという問題点を有しており、好ましい方法とは言えない。

【0007】

【発明の目的】本発明は、上記の如き状況に鑑みなされたもので、容易に入手できる試薬を用いて、簡便な操作により実施可能なET活性の選択的な抑制方法、及び、このような方法を用いて試料中のET類縁物質を測定する方法及びそのための試薬を提供することを目的とする。

【0008】

【発明の構成】本発明は、ETを含む試料に、ETと結合してETの活性を抑制する性質を有するペプチド誘導体（又は蛋白質）（以下、ET抑制ペプチドと略記する。）と界面活性剤とを共存させることを特徴とする、

ETの活性抑制方法の発明である。

【0009】また、本発明は、上記抑制方法により処理した試料を、AL溶液と反応させ、その結果生ずる酵素活性化反応により活性化された酵素の活性を測定するか、又はその結果生ずるゲル化反応に基づく反応液の濁度の変化の程度やゲル化状態の程度を機器又は目視により測定することを特徴とする、試料中に存在する、ET類縁物質の測定方法の発明である。

【0010】更に、本発明は、ET抑制ペプチド及び界面活性剤を含む水溶液であって、AL溶液とは反応せず、且つAL溶液とET類縁物質との反応を阻害も促進もしないことを特徴とする、ETの活性抑制用前処理液の発明である。

【0011】更にまた、本発明は、ET抑制ペプチド、界面活性剤及びAL溶液を含んでなる、ET類縁物質の測定試薬の発明である。

【0012】即ち、本発明者らは、AL溶液を用いた、ETや $\beta$ G等のAL溶液活性化物質の特異的測定法を見出すべく鋭意研究の途上、界面活性剤とET抑制ペプチドとを、試料又はAL溶液活性化物質測定時の反応液中に共存させた場合には、これらに含まれるETの活性のみが抑制され、それ以外のET類縁物質、例えば $\beta$ G等の特異的に検出できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0013】更に詳細に述べれば、界面活性剤や、ポリミキシン等に代表されるET抑制ペプチドが夫々ET活性を失活させる性質を有していることはよく知られていたが、これらを単独で用いてET活性を完全に失活させるためには大量に添加する必要があった。そのため、これらの何れかを単独で用いて処理した試料について、該試料中のET類縁物質の測定をリムルテスト等により行った場合には、AL溶液中の酵素の活性化を阻害する等の影響が生じて、正確な測定値が得られないという問題があった。ところが、これらを併用すると、リムルテスト等への影響が生じない範囲内の量を添加した場合でも試料中のET活性を完全に失活させることができることを、本発明者らが見出し、本発明を完成させるに至ったのである。

【0014】本発明に於いて用いられる界面活性剤としては、ET類縁物質によるAL溶液の活性化反応（酵素活性化反応やゲル化反応等）を阻害も促進もしないものであって、且つ該反応時に非特異的な濁りを生じさせることのないものであれば特に限定されることなく挙げられるが、具体的には、例えばポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンラウリルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルエーテル類、例えばポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル類、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレート、ポリオキシエチレンソルビ

タンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレート等のポリオキシエチレンアルキルエステル類、例えばオクタノイル-N-メチルグルカミド、ノナノイル-N-メチルグルカミド、デカノイル-N-メチルグルカミド等のメチルグルカミド誘導体、例えばn-オクチル-β-D-グルコシド等のアルキル糖誘導体等の非イオン界面活性剤、例えばドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、ラウリルベンゼンスルホン酸、デオキシコール酸、コール酸、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンドデシルサルフェイト(Tris DS)等のアニオン界面活性剤、例えばオクタデシルアミン酢酸塩、テトラデシルアミン酢酸塩、ステアリルアミン酢酸塩、ラウリルアミン酢酸塩、ラウリルジエタノールアミン酢酸塩等のアルキルアミン塩、例えば塩化オクタデシルトリメチルアンモニウム、塩化ドデシルトリメチルアンモニウム、塩化セチルトリメチルアンモニウム、臭化セチルトリメチルアンモニウム、メチル硫酸アリルトリメチルアンモニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化テトラデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ラウリルジメチルベンジルアンモニウム等の第4級アンモニウム塩、例えば塩化ラウリルピリジニウム、塩化ステアリルアミドメチルピリジニウム等のアルキルピリジニウム塩等のカチオン界面活性剤、3-[(3-コラミドアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネイト、3-[(3-コラミドアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネイト等の両性界面活性剤、サポニン(大豆由来)、ジギトニン等の天然の界面活性剤等の界面活性剤が挙げられるが、反応時の酵素系等への影響を考慮すると、中でも非イオン界面活性剤又は両性界面活性剤が好ましく挙げられる。これらは単独で用いても、適宜組み合わせ用いても何れでもよい。また、これらの使用濃度としては、界面活性剤の種類や処理する試料により異なるが、ET抑制ペプチドが共存した場合にET活性を十分に抑制し得る濃度であって且つ例えばβG等のET類縁物質のAL溶液に対する反応性を促進も阻害もしない濃度であれば特に限定されることなく選択できるが、より具体的にはETを含む試料中の濃度、或は該試料とAL溶液とを反応させた際の溶液中の濃度として通常0.005~5w/v%、好ましくは0.05~2.5w/v%、更に好ましくは0.1~1w/v%の範囲から適宜選択して用いられる。

【0015】本発明に於いて用いられるET抑制ペプチド等としては、ETと結合してETの活性を抑制する性質を有するペプチド誘導体(又は蛋白質)であれば特に限定されることなく挙げられるが、塩基性が強い、又は疎水性部位を多く持つ、或はこれら二つの性質を併せ持つものが好ましい。そのようなペプチド誘導体(又は蛋白質)としては、例えばBacillus polymyxa等が産生するポリミキシン、例えばカプトガニ血球成分由来の

タキプレシン(Tachyplesin)、ポリフェムシン(Polyp hemusin)、抗リポ多糖因子(Anti-LPS Factor)等が好ましく挙げられる。尚、タキプレシン(Tachyplesin)、ポリフェムシン(Polyphemusin)、抗リポ多糖因子(Anti-LPS Factor)等は、一般的に入手が難しく且つ高価であるので、ポリミキシンを使用するのが経済的には有利である。また、ポリミキシンとしては、例えばポリミキシンA、B、C、D、E、K、M、P等であれば、単一の成分として精製されたものでも、これらの内のいくつかの混合物でも、また、塩の形になったものでも何れにてもよく、特に限定されることなく挙げられるが、入手の容易さを考慮するとポリミキシンBの硫酸塩が好ましく挙げられる。また、この使用濃度としては、ET抑制ペプチドの種類や処理する試料により異なるが、界面活性剤が共存した場合にET活性を十分に抑制し得る濃度であって且つ例えばβG等のET類縁物質のAL溶液に対する反応性を促進も阻害もしない濃度であれば特に限定されることなく選択できるが、より具体的にはETを含む試料中の濃度、或は該試料とAL溶液とを反応させた際の溶液中の濃度として通常0.00001~0.1w/v%、好ましくは0.0001~0.05w/v%、更に好ましくは0.001~0.01w/v%の範囲から適宜選択して用いられる。

【0016】本発明の抑制方法を実施するには、例えば以下の如く行えばよい。即ち、ETを含む試料中に、或は該試料とAL溶液とを反応させる際に、上記した如き界面活性剤及びET抑制ペプチドを上記した如き濃度となるように、共存させておけば足りる。尚、本発明の抑制方法により一旦処理を行った試料についてET類縁物質の測定を行う場合には、AL溶液との反応時の界面活性剤とET抑制ペプチドの濃度が上記した如き濃度よりも低くなっている場合でも何ら差し支えないことは言うまでもない。

【0017】本発明の抑制方法を、加熱可能な試料中のET活性の抑制に使用する場合は、加熱処理を併用することにより更に効果的にET活性を抑制することができる。特に、血漿や血清等のように阻害因子等を含む試料中のET類縁物質をリムルテスト等で測定する場合、阻害因子等による影響を除去するための前処理方法として加熱処理を併用することが望ましい。加熱処理は、界面活性剤とET抑制ペプチドとを共存させる前に行っても、共存させた後に行っても何れにてもよいが、共存させた後のほうが効果が高い場合が多いので望ましい。尚、加熱処理に於ける加熱温度としては、特に限定されないが、通常60~220℃、好ましくは70~100℃程度が挙げられ、加熱時間としては、特に限定されないが、通常3~60分間、好ましくは5~15分間程度が挙げられる。また、加熱方法としては、上記した如き加熱条件で試料の加熱を行える方法であればどのような方法でもよいが、例えばインキュベーターによる加熱方法、オートクレーブによる加熱方法等が好ましく挙げられる。

【0018】ETを含む試料中に、或は該試料とAL溶液とを反応させる際に、界面活性剤及びET抑制ペプチドを共存させる方法としては、ETによるAL溶液の活性化が開始される前に上記した如き濃度の界面活性剤及びET抑制ペプチドが、該試料又はAL溶液に添加される様な方法であればどのような方法でもよいが、例えば以下の方法が挙げられる。

【0019】1) ETを含む試料を、界面活性剤とET抑制ペプチドとを適量含む溶液（或は界面活性剤を適量含む溶液とET抑制ペプチドを適量含む溶液）であって、AL溶液を活性化せず且つAL溶液とET類縁物質との反応を阻害も促進もしない溶液で適宜希釈する方法。

【0020】2) ET類縁物質を測定する場合であれば、AL溶液に予め界面活性剤とET抑制ペプチドとを適量含有させておき、該AL溶液と測定用試料とを適宜混合する方法。

【0021】尚、上記1)の方法による場合、該試料の希釈倍率としては、特に限定されないが、該試料が血漿等の場合には希釈倍率が低すぎると、加熱時に於ける血漿蛋白質の変性等で血漿を希釈した液の粘性が上がったり、該液中に沈殿が生じる等の問題が生じたり、希釈倍率が高すぎるとETを適切に検出し得なくなる等の問題が生じる場合があるので、このような場合には通常5～20倍、好ましくは8～12倍程度が挙げられる。

【0022】上記1)の方法に於いて用いられる、界面活性剤及びET抑制ペプチドを含む溶液、或はこれらを夫々別々に含む溶液は、上記した如き界面活性剤又は/及びET抑制ペプチドを適当な濃度の水溶液とした後、AL溶液を活性化せず、且つリムルステスト等の反応を促進も阻害もしないことを確認した後に使用するのが望ましい。尚、界面活性剤又は/及びET抑制ペプチドを含む溶液は、滅菌のために121℃で20分間オートクレーブ処理を行ったものでもよい。該溶液中の界面活性剤の濃度としては、目的の試料を希釈した後の最終濃度が上記した如き濃度となるような範囲であれば特に限定されないが、操作性を考慮すると通常0.01～10w/v%、好ましくは0.1～5w/v%、更に好ましくは0.2～2w/v%の範囲が挙げられる。また、該溶液中のET抑制ペプチドの濃度としては、目的の試料を希釈した後の最終濃度が上記した如き濃度となるような範囲であれば特に限定されないが、操作性を考慮すると通常0.0002～0.2w/v%、好ましくは0.0002～0.1w/v%、更に好ましくは0.002～0.2w/v%の範囲が挙げられる。

【0023】また、上記2)の方法で用いられる所定濃度のET抑制ペプチドと界面活性剤とを含有させたAL溶液は、一旦凍結乾燥して試薬の形態として保存し、その後注射用蒸留水等のAL溶液活性化物質を含まない水で再溶解して使用することも当然可能である。

【0024】本発明の抑制方法によれば、少量のET抑

制ペプチドと界面活性剤とを併用することにより、試料中のET活性を完全に失活させることができるので、本発明の抑制方法は極めて経済的な方法である。また、本発明の抑制方法により処理した試料は、ET抑制ペプチドと界面活性剤の含有量が少ないので、これらによるリムルステスト等への影響を考慮することなく、リムルステスト等を利用したET類縁物質の測定用試料として利用することが可能である。

【0025】尚、ETの種類（由来）によっては、例えばE.coli 0127:B8 由来のETの場合には、低濃度のET抑制ペプチドのみによりそのET活性を充分に抑制することは可能である。しかしながら、どのような種類のETが含まれているかが明確ではない試料中のET類縁物質の測定を行うためにET活性を抑制する必要がある場合には、本発明の抑制方法を利用するほうが好ましいことは言うまでもないであろう。

【0026】本発明に係るエンドトキシンの活性抑制方法は、例えば下記のような場合に、有効に用いることができる。即ち、リムルステスト等により検体中のβ-グルカンの量を測定する際、検体中に混在するエンドトキシンが測定結果に影響を及ぼすことを防止するために用いることができる。また、検体にLALを添加してLALを活性化した後、合成基質を添加して検体中のエンドトキシン又はβ-グルカンを測定する方法に於て、合成基質等の使用試薬のエンドトキシン汚染を排除するために用いることができる。更に、例えば培養細胞等を用いた実験に於て、培養細胞がエンドトキシンの影響を受け易い性質のものであるとき、使用試薬のエンドトキシンの汚染を排除するためにも用いることができる。

【0027】本発明の抑制方法により処理した試料中のET類縁物質を測定するに当たっては、所謂リムルステスト等、即ちトキシノメーターET-201（和光純薬工業(株)製）、トキシノメーターMT-251（和光純薬工業(株)製）、LAL-5000 [ACC (ASSOCIATES OF CAPE COD) 社製] 等の専用装置を用いる比濁時間分析法等や、或はAL溶液が活性化したときに現れるプロテアーゼ活性を合成基質を用いて測定する合成基質法、ALの活性化によって形成されるゲルを目視によって判定するゲル化転倒法等のAL溶液を用いた常法により実施すれば足りる。

【0028】本発明に係るET類縁物質としては、ET以外の物質であってAL溶液と反応して酵素活性化反応やゲル化反応を生じさせるものであれば特に限定されることなく挙げられるが、例えば(1→3)-β-D-グルカン及びその誘導体が代表的なものとして挙げられる。尚、(1→3)-β-D-グルカン及びその誘導体としては、(1→3)-β-D-グルカンをその構成成分として含む多糖類であれば特に限定されることなく挙げることができるが、例えば各種細菌類（例えば、Alcaligenes属、Agrobacterium属等）、酵母類（例えば、Sa

ccharomyces属、Candida属、Cryptococcus属、Trichosporon属、Rhodotorula属等)カビ類(Aspergillus属、Mucor属、Penicillium属、Trichophyton属、Sporothrix属、Phialophora属等)、放線菌類(Actinomyces属、Nocardia属等)、キノコ類(例えば、シイタケ、スエヒロタケ、カワラタケ等)等の細胞壁等から得られる天然の多糖、具体的には例えばカードラン、パキマン、スクレロタン、レンチナン、シゾフィラン、コリオラン等、或は、藻類(例えば、褐藻、ユーグレナ、ケイ藻等)の貯蔵性多糖、具体的には例えばラミナラン、パラミロン等、或は又これらに常法、例えば大有機化学第19巻、第7版、70~101頁、小竹無二雄監修、昭和42年5月10日、朝倉書店; A. E. Clarkeら、Phytochemistry, vol. 1, 175-188 (1967); T. Sasakiら、Europ. J. Cancer, vol. 15, 211-215 (1967)等に記載された方法に準じて例えば硫酸基、カルボキシメチル基、カルボキシエチル基、メチル基、ヒドロキシエチル基、ヒドロキシプロピル基、スルホプロピル基等を導入して得られる誘導体等が好ましく挙げらる。

【0029】また、この際に用いることのできるAL溶液としては、通常のETの測定に使用できるものであれば特に限定されことなく挙げることができるが、例えば、ACC社、ヘマケム社、ウィタカーバイオプロダクト社、エンドセーフ社、帝国臓器(株)、生化学工業(株)等によって製造された市販のAL溶液の凍結乾燥品から調製されたものを用いてもよいし、リムルス(Limulus)属、タキプレウス(Tachyplesus)属或はカルシノスコルピウス(Carcinoscorpius)属に属するカブトガニの血球から抽出されたもので、AL溶液活性化物質との反応により酵素(プロテアーゼ等)の活性化やゲル化反応が生じるものであれば、特に限定されことなく挙げられる。

【0030】以下に、実施例を挙げ、本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【0031】

【実施例】

実施例 1.

〔試薬〕

・ET溶液

E. coli 055:B5 LPS (Difco社製)を10 mg秤取し、注射用蒸留水10 mlで溶解して1 mg/ml溶液を調製して原液とし、これを注射用蒸留水で適宜希釈したものを用いた。

・AL溶液

リムルス属カブトガニ由来のAL溶液の凍結乾燥品(以下、LALと略記する。和光純薬(株)販売、2 ml用。)をLAL溶解用緩衝液(HS)(和光純薬工業(株)製)で溶解して得たLAL溶解液を使用した。

・界面活性剤水溶液

ポリオキシエチレングリコール p-t-オクチルフェニルエーテル(非イオン界面活性剤、和光純薬工業(株))

製)を注射用蒸留水で10w/v%まで希釈したものを、121℃で20分間オートクレーブ処理したものを原液とし、これを注射用蒸留水で適宜希釈した後、AL溶液を活性化しないこと及びリムルステスト等によるβG等の測定を阻害も促進もしないことを確認したものを用いた。

・ポリミキシンB(以下、PxBと略記する。)水溶液 PxB硫酸塩(和光純薬工業(株)製)を注射用蒸留水で1.0w/v%まで希釈したものを、121℃で20分間オートクレーブ処理したものを原液とし、これを注射用蒸留水(又は上記で調製した0.2w/v%の界面活性剤水溶液)で適宜希釈した後、AL溶液を活性化しないこと及びリムルステスト等によるβG等の測定を阻害も促進もしないことを確認したものを用いた。

〔操作法〕ヘパリン処理した正常人血漿2.0 mlに所定濃度のET溶液20 μlを添加し、得られたET添加血漿100 μlを、注射用蒸留水、所定濃度のPxB水溶液又は所定濃度の界面活性剤水溶液900 μlで10倍希釈したものを、80℃で5分間加熱処理した後、直ちに氷冷した

(ETの終濃度は2 ng/ml、PxBの終濃度は0.0018~0.009w/v%、界面活性剤の終濃度は0.09~0.45w/v%)。得られた希釈血漿中のET濃度を、トキシノメーターMT-251(和光純薬工業(株)製)を用いて、常法に従って以下のように測定した。即ち、0.1 mlのLAL溶液に0.1 mlの上記希釈血漿を加えて攪拌混合後、37℃保温下に上記混合液の透過光量が5%減少するまでの時間(以下、Tgと略記する。)を測定した。得られたTgを、予め各種濃度のET溶液を検体として同様の操作を行って作成した、ET濃度とTgとの関係を表す検量線に当てはめ、該希釈血漿中のET濃度を求めた。

〔結果〕得られた結果を図1及び2に示す。尚、図1は、界面活性剤溶液で希釈した血漿について得られた結果を示し、横軸の各界面活性剤濃度(加熱処理時の)に対して得られた希釈加熱血漿のゲル化時間(Tg)を縦軸に沿ってプロットした点を結んだものである。また、図2は、PxB溶液で希釈した血漿について得られた結果を示し、横軸の各PxB濃度(加熱処理時の)に対して得られた希釈処理血漿のゲル化時間(Tg)を縦軸に沿ってプロットした点を結んだものであり、図中、—△—はPxBのみを含む水溶液を用いて得られた結果を、—□—はPxBと共に0.2w/v%の界面活性剤(ポリオキシエチレングリコール p-t-オクチルフェニルエーテル)を含む水溶液を用いて得られた結果(加熱処理時の界面活性剤濃度は0.18w/v%)を夫々示す。また、図2に於いて、(□)は、Tgが90分以上であったこと、言い換えればETが検出されなかったことを示す。図1の結果から明らかな如く、注射用蒸留水により希釈した血漿について得られたTgが7.8分であったのに対し、血漿を0.1~0.5%の界面活性剤水溶液で希釈した場合には(加熱処理時の界面活性剤濃度は0.09~0.45w/v%)、Tgが16.3~33.7分と遅くなりETのAL溶液活性化能

(ET活性)が低下することが判る(Tgが短い程ET活性は高い。)。また、図2の結果から明らかな如く、注射用蒸留水により希釈した血漿について得られたTgが7.8分であったのに対し、血漿を0.002~0.01w/v%のPxB水溶液で希釈した場合には(加熱処理時のPxB濃度は0.0018~0.009w/v%)、Tgが24.2~32.9分と遅くなりET活性が低下することが判る。更に、図2の結果から、血漿を0.002~0.01w/v%のPxBと共に0.2%の界面活性剤を含む水溶液で希釈した場合には(加熱処理時の界面活性剤濃度は0.18%、PxB濃度は0.0018~0.009w/v%)、ETが検出されなくなる(Tgが90分以上となる)ことが判る。以上の結果から明らかな如く、血漿へ添加したE.coli 055:B5 LPSのET活性は、界面活性剤とPxBとを共存させることにより、完全に阻害されることが判る。

#### 【0032】実施例 2.

##### 〔試薬〕

AL溶液、界面活性剤水溶液及びPxB水溶液は、実施\*

表1

| 希釈溶液                       | Tg(min) | 濃度値(pg/ml) |
|----------------------------|---------|------------|
| 注射用蒸留水                     | 10.0    | 289.1      |
| 0.04% 界面活性剤水溶液             | 6.3     | 2363.0     |
| 0.2% 界面活性剤水溶液              | 40.4    | 3.4        |
| 0.01% PxB水溶液(0.2%の界面活性剤含有) | 90<     | —          |

【0034】表1の結果から明らかな如く、注射用蒸留水により希釈した血漿について得られたTgが10.0分であつたのに対し、血漿を0.2w/v%の界面活性剤水溶液で希釈した場合には(加熱処理時の界面活性剤濃度は0.18w/v%)、Tgが40.4分と遅くなりET活性が低下することが判る。また、血漿を0.01w/v%のPxB水溶液(0.2w/v%の界面活性剤含有。)により希釈した場合には

(加熱処理時のPxB濃度は0.009w/v%、界面活性剤濃度は0.18w/v%)、ETが検出されなくなる(Tgが90分以上となる)ことが判る。尚、0.04%の界面活性剤水溶液により血漿を希釈した場合には、注射用蒸留水により希釈した血漿について得られた場合よりもTgが小さくなっている(ET活性が高くなっている)が、これは界面活性剤の添加により血漿中に存在する、ETとAL溶液との反応に対する阻害因子の影響が軽減したためであると推測される。以上の結果から明らかな如く、血漿へ添加したE.coli 0111:B4 LPSのET活性は、界面活性剤とPxBとを共存させることにより、完全に阻害されることが判る。

#### 【0035】実施例 3.

\*例1と同じものを使用した。

##### ・ET溶液

E.coli 0111:B4 LPS (Difco社製)を10 mg秤取し、注射用蒸留水10 mlで溶解して1 mg/ml溶液を調製して原液とし、これを注射用蒸留水で適宜希釈したものをを用いた。

〔操作法〕ヘパリン処理した正常人血漿0.6 mlに所定濃度のET溶液12  $\mu$ lを添加し、得られたET添加血漿100  $\mu$ lを、注射用蒸留水、0.04w/v%の界面活性剤水溶液、0.2w/v%の界面活性剤水溶液又は0.01w/v%のPxB水溶液[0.2w/v%の界面活性剤(ポリオキシエチレングリコール p-t-オクチルフェニルエーテル)含有。]900  $\mu$ lで10倍希釈したものを、80℃で5分間加熱処理した後、直ちに氷冷した(ETの終濃度は1.96 ng/ml)。得られた希釈血漿中のET濃度を、実施例1と同様の操作法により求めた。

〔結果〕得られた結果を表1に示す。

#### 【0033】

##### 【表1】

〔試薬〕AL溶液、界面活性剤水溶液及びPxB水溶液は、実施例1と同じものを使用した。

##### ・ET溶液

E.coli 0127:B8 LPS (Difco社製)を10 mg秤取し、注射用蒸留水10 mlで溶解して1 mg/ml溶液を調製して原液とし、これを注射用蒸留水で適宜希釈したものをを用いた。

〔操作法〕ヘパリン処理した正常人血漿0.7 mlに所定濃度のET溶液14  $\mu$ lを添加し、得られたET添加血漿100  $\mu$ lを、注射用蒸留水、0.04w/v%の界面活性剤水溶液、0.2w/v%の界面活性剤水溶液、0.01w/v%のPxB水溶液又は0.2w/v%の界面活性剤(ポリオキシエチレングリコール p-t-オクチルフェニルエーテル)を含有する0.01w/v%のPxB水溶液900  $\mu$ lで10倍希釈したものを、80℃で5分間加熱処理した後、直ちに氷冷した(ETの終濃度は1.96 ng/mlとなった。)。得られた希釈血漿中のET濃度を、実施例1と同様の操作法により求めた。

〔結果〕得られた結果を表2に示す。

#### 【0036】

##### 【表2】



表 2

| 希釈溶液                             | Tg(min) | 濃度値(μg/ml) |
|----------------------------------|---------|------------|
| 注射用蒸留水                           | 10.6    | 221.2      |
| 0.04% 界面活性剤水溶液                   | 6.6     | 2152.0     |
| 0.2% 界面活性剤水溶液                    | 28.6    | 6.3        |
| 0.01% P x B水溶液                   | 90<     | —          |
| 0.01% P x B水溶液(0.2%<br>の界面活性剤含有) | 90<     | —          |

【0037】表2の結果から明らかな如く、注射用蒸留水により希釈した血漿について得られたTgが10.6分であったのに対し、血漿を0.2w/v%の界面活性剤水溶液で希釈した場合には（加熱処理時の界面活性剤濃度は0.18w/v%。）、Tgが28.6分と遅くなりET活性が低下することが判る。また、血漿を0.01w/v%のP x B水溶液又は0.2w/v%の界面活性剤を含有する0.01w/v%のP x B水溶液により希釈した場合には（加熱処理時のP x B濃度は0.009w/v%、界面活性剤濃度は0.18w/v%。）、ETが検出されなくなる（Tgが90分以上となる）ことが判る。尚、0.04%の界面活性剤水溶液により血漿を希釈した場合には、注射用蒸留水により希釈した血漿について得られた場合よりもTgが小さくなっている（ET活性が高くなっている）が、これは界面活性剤の添加により血漿中に存在するETとAL溶液との反応に対する阻害因子の影響が軽減したためであると推測される。以上の結果から明らかな如く、血漿へ添加したE. coli 0127:B8 LPSのET活性は、P x Bを0.009w/v%、又は界面活性剤とP x Bとを共存させることにより、完全に阻害されることが判る。

#### 【0038】実施例 4.

【試薬】AL溶液、界面活性剤水溶液及びP x B水溶液は、実施例1と同じものを使用した。

##### ・ET溶液

E. coli 0128:B12 LPS (Difco社製) を10 mg秤取し、注射用蒸留水10 mlで溶解して1 mg/ml溶液を調製して原液とし、これを注射用蒸留水で適宜希釈したものを用いた。

【操作法】ヘパリン処理した正常人血漿1.3 mlに所定濃度のET溶液13 μlを添加し、得られたET添加血漿100 μlを、注射用蒸留水、所定濃度の界面活性剤水溶液、所定濃度のP x B水溶液又は0.1w/v%若しくは0.2w/v%の界面活性剤（ポリオキシエチレングリコール p-t-オクチルフェニルエーテル）を含む所定濃度のP x B水溶液900 μlで10倍希釈したものを、80℃で5分間加熱処理した後、直ちに氷冷した（ETの終濃度は2 ng/ml、P x Bの終濃度は0.00009～0.009w/v%、界面活性剤の終濃度は0.09～0.9w/v%。）。得られた希釈血漿中のET濃度を、実施例1と同様の操作法により求めた。

【結果】得られた結果を図3～5に示す。尚、図3は、界面活性剤溶液で希釈した血漿について得られた結果を示し、横軸の各界面活性剤濃度（加熱処理時の）に対して得られた希釈加熱血漿のゲル化時間（Tg）を縦軸に沿ってプロットした点を結んだものである。図4は、P x B溶液で希釈した血漿について得られた結果を示し、横軸の各P x B濃度（加熱処理時の）に対して得られた希釈加熱血漿のゲル化時間（Tg）を縦軸に沿ってプロットした点を結んだものである。図5は、界面活性剤とP x Bとを含む水溶液で希釈した血漿について得られた結果を示し、横軸の各P x B濃度（加熱処理時の）に対して得られた希釈処理血漿のゲル化時間（Tg）を縦軸に沿ってプロットした点を結んだものである。図中、一□一は0.1w/v%の界面活性剤を含有する水溶液を用いて（加熱処理時の界面活性剤濃度は0.09w/v%。）得られた結果を、一×一は0.2w/v%の界面活性剤を含有する水溶液を用いて（加熱処理時の界面活性剤濃度は0.18w/v%。）得られた結果を夫々示す。また、図4に於ける

（○）及び図5に於ける（□）及び（×）は、何れもTgが90分以上であったこと、言い換えればETが検出されなかったことを示す。図3～5の結果から明らかな如く、P x Bを0.009w/v%共存させるか、界面活性剤とP x Bとを共存させた場合に、血漿中のET活性を完全に阻害することができることが判る。また、ET活性の抑制を本発明の抑制方法により行えば、P x Bの使用量を低減することができること（P x B単独の場合の1/100量で可）、言い換えれば、本発明の方法は、従来のP x Bを単独で用いる方法に比較して経済的に優れた方法であることも判る。

#### 【0039】実施例 5.

【試薬】AL溶液、界面活性剤水溶液及びP x B水溶液は、実施例1と同じものを使用した。

##### ・ET溶液

Salmonella typhimurium LPS (Difco社製) を10 mg秤取し、注射用蒸留水10 mlで溶解して1 mg/ml溶液を調製して原液とし、これを注射用蒸留水で適宜希釈したものを用いた。

【操作法】ヘパリン処理した正常人血漿1.0 mlに所定濃度のET溶液10 μlを添加し、得られたET添加血漿10

0  $\mu$ lを、注射用蒸留水、0.2w/v%の界面活性剤水溶液、0.01w/v%のP x B水溶液又は0.2w/v%の界面活性剤（ポリオキシエチレングリコール p-t-オクチルフェニルエーテル）を含む0.01w/v%のP x B水溶液900  $\mu$ lで10倍希釈したものを、80℃で5分間加熱処理した後、直ちに氷冷した（E Tの終濃度は2 ng/ml。）。得られた希釈血 \*

\* 表3

| 希釈溶液                         | Tg(min) | 濃度値(pg/ml) |
|------------------------------|---------|------------|
| 注射用蒸留水                       | 8.2     | 453.6      |
| 0.2% 界面活性剤水溶液                | 12.3    | 77.9       |
| 0.01% P x B水溶液               | 13.4    | 55.7       |
| 0.01% P x B水溶液(0.2%の界面活性剤含有) | 90<     | —          |

【0041】表3の結果から明らかな如く、血漿へ添加したSalmonella typhimurium LPSのE T活性は、界面活性剤とP x Bとを共存させることにより、完全に阻害されることが判る。

【0042】実施例 6.

〔試薬〕A L溶液、界面活性剤水溶液及びP x B水溶液は、実施例1と同じものを使用した。

・ $\beta$ -グルカン水溶液

直鎖の(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカン誘導体であるカルボキシメチル化カードラン（和光純薬工業(株)製）を100 mg秤取し、注射用蒸留水10 mlで溶解して、10 mg/ml溶液を調製して原液とし、これを注射用蒸留水で適宜希釈したものを用いた。

〔操作法〕50ng/mlの $\beta$ -グルカン水溶液100  $\mu$ lを、0.2 30 w/v%の界面活性剤水溶液、0.01w/v%のP x B水溶液又は0.2w/v%のポリオキシエチレングリコール p-t-オク \*

20

※チルフェニルエーテルを含む0.01w/v%のP x B水溶液900  $\mu$ lで10倍希釈し、 $\beta$ -グルカン添加溶液とした（ $\beta$ -グルカンの終濃度は5 ng/ml。）。該溶液中の $\beta$ -グルカン濃度を、トキシノメーターMT-251（和光純薬工業(株)製）を用いて、常法に従って以下のように行った。0.1 mlのL A L溶液に0.1 mlの上記希釈溶液を加えて攪拌混合後、37℃保温下に上記混合液の透過光量が5%減少するまでの時間（以下、T gと略記する。）を測定した。得られたT g値を、予め各種濃度の $\beta$ -グルカン水溶液を検体として同様の操作を行って作成した、 $\beta$ -グルカン濃度とT gとの関係を表す検量線に当てはめ、 $\beta$ -グルカン濃度を求め、この結果に基づいて $\beta$ -グルカンの回収率を算出した。

〔結果〕得られた結果を表4に示す。

【0043】

【表4】

\* 表4

| 希釈溶液                         | $\beta$ -グルカン回収率(%) |
|------------------------------|---------------------|
| 0.2% 界面活性剤水溶液                | 100                 |
| 0.01% P x B水溶液               | 112                 |
| 0.01% P x B水溶液(0.2%の界面活性剤含有) | 88                  |

【0044】表4の結果から明らかな如く、何れの希釈溶液を用いた場合も、 $\beta$ -グルカンの回収率は約90~110%と良好であった。従って、何れの希釈溶液もA L溶液と $\beta$ -グルカンとの反応を阻害も促進もしないことが判る。

【0045】実施例 7.

〔試薬〕A L溶液、界面活性剤水溶液及びP x B水溶液は、実施例1と同じものを使用した。

・E T溶液

50

E.coli 026:B6 LPS (Difco社製) を10 mg秤取し、注射用蒸留水10 mlで溶解して1 mg/ml溶液を調製して原液とし、これを注射用蒸留水で適宜希釈したものを用いた。

・界面活性剤水溶液

デオキシコール酸ナトリウム（陰イオン界面活性剤、和光純薬工業(株)製）、エマルゲン709（非イオン界面活性剤、ポリオキシエチレン高級アルコールエーテル、花王(株)商品名）、アンヒトール20N（両性界面活性剤、花王(株)商品名、主成分：ラウリルジメチルアミンオキ

シド)を、界面活性剤として用いた以外は、実施例1と同様の操作により各種界面活性剤水溶液を調製した。

〔操作法〕ヘパリン処理した正常人血漿1.7 mlに所定濃度のET溶液17  $\mu$ lを添加し、得られたET添加血漿100  $\mu$ lを、注射用蒸留水、0.1w/v%のデオキシコール酸ナトリウム水溶液、0.2w/v%のエマルゲン709水溶液、0.4w/v%のアンヒトール20N水溶液、0.01w/v%のP x B水溶液、0.01w/v%のP x Bを含む0.1w/v%のデオキシコール酸ナトリウム水溶液、0.01w/v%のP x Bを含む0.2w/v%

\*  
表5

| 希釈溶液                                     | Tg(min) | 濃度値(pg/ml) |
|--|---------|------------|
| 注射用蒸留水                                   | 9.0     | 1019.0     |
| 0.1% デオキシコール酸ナトリウム水溶液                    | 7.5     | 2287.0     |
| 0.2% エマルゲン709水溶液                         | 27.3    | 22.7       |
| 0.4% アンヒトール20N水溶液                        | 52.6    | 4.3        |
| 0.01% P x B水溶液                           | 30.8    | 16.2       |
| 0.1% デオキシコール酸ナトリウム水溶液<br>(P x Bを0.01%含有) | 90<     | —          |
| 0.2% エマルゲン709水溶液<br>(P x Bを0.01%含有)      | 90<     | —          |
| 0.4% アンヒトール20N水溶液<br>(P x Bを0.01%含有)     | 90<     | —          |

【0047】表5の結果から明らかな如く、血漿へ添加したE. coli 026:B6 LPS のET活性は、界面活性剤とP x Bとを共存させることにより、完全に阻害されることが判る。

【0048】実施例 8.

〔試薬〕AL溶液、界面活性剤水溶液及びP x B水溶液は、実施例1と同じものを使用した。

・界面活性剤水溶液

ポリオキシエチレングリコール p-t-オクチルフェニルエーテル (非イオン界面活性剤、和光純薬工業(株)製)、エマルゲン709 (非イオン界面活性剤、ポリオキシエチレン高級アルコールエーテル、花王(株)商品名)、アンヒトール20N (両性界面活性剤、花王(株)商品名、主成分：ラウリルジメチルアミノオキンド)を、界面活性剤として用いた以外は、実施例1と同様の操作により各種界面活性剤水溶液を調製した。

・ET溶液Salmonella typhosa 0901 LPS (Difco社製)

\*のエマルゲン709水溶液又は0.01w/v%のP x Bを含む0.4w/v%のアンヒトール20N水溶液900  $\mu$ lで10倍希釈したものを、80℃で5分間加熱処理した後、直ちに氷冷した(ETの終濃度は4 ng/ml。)。得られた希釈血漿中のET濃度を、実施例1と同様の操作法により求めた。

〔結果〕得られた結果を表5に示す。

【0046】

【表5】

を10 mg秤取し、注射用蒸留水10mlで溶解して1 mg/ml溶液を調製して原液とし、これを注射用蒸留水で適宜希釈したものを用いた。

〔操作法〕ヘパリン処理した正常人血漿1.0 mlに所定濃度のET溶液10  $\mu$ lを添加し、得られたET添加血漿100  $\mu$ lを、注射用蒸留水、0.01w/v%のP x Bを含む0.2w/v%のポリオキシエチレングリコール p-t-オクチルフェニルエーテル水溶液、0.01w/v%のP x Bを含む0.2w/v%のエマルゲン709水溶液又は0.01w/v%のP x Bを含む0.4w/v%のアンヒトール20N水溶液900  $\mu$ lで10倍希釈したものを、80℃で5分間加熱処理した後、直ちに氷冷した(ETの終濃度は4 ng/ml。)。得られた希釈血漿中のET濃度を、実施例1と同様の操作法により求めた。

〔結果〕得られた結果を表6に示す。

【0049】

【表6】

表6

| 希釈溶液   | Tg(min) | 濃度値(pg/ml) |
|--|---------|------------|
| 注射用蒸留水   | 7.8     | 910.9      |
| 0.2% ポリオキシエチレングリコール p-t-オクチルフェニルエーテル水溶液<br>(P x Bを0.01%含有) | 90<     | —          |
| 0.2% イマルゲン709水溶液<br>(P x Bを0.01%含有)                        | 90<     | —          |
| 0.4% 7ンヒトール20N水溶液<br>(P x Bを0.01%含有)                       | 90<     | —          |

【0050】表6の結果から明らかな如く、血漿へ添加したSalmonella typhosa 0901 LPSのET活性は、界面活性剤とP x Bとを共存させることにより、完全に阻害されることが判る。

【0051】実施例 9.

〔試薬〕AL溶液、界面活性剤水溶液及びP x B水溶液は、実施例1と同じものを使用した。

・β-グルカン水溶液

直鎖の(1→3)-β-D-グルカンであるカードラン(和光純薬工業(株)製)を108 mg秤取し、注射用蒸留水10 mlを加えた後、1 Nの水酸化ナトリウム800 μlを添加することによって溶解し、10 mg/ml溶液を調製した。注射用蒸留水で10倍希釈し、1 mg/mlとしたものを原液とし、これを注射用蒸留水で適宜希釈したものを用いた。

〔操作法〕10 ng/mlのβ-グルカン水溶液100 μlを0.01 w/v%のP x Bを所定濃度の界面活性剤水溶液900 μlで10倍希釈し、β-グルカン添加溶液とした(β-グルカンの終濃度は1 ng/ml。また、β-グルカン添加溶液中のP x Bの終濃度は0.009w/v%、界面活性剤の終濃度は0.9~4.5w/v%)。得られた各種、β-グルカン添加溶液からのβ-グルカン回収率を、実施例6と同様の操作法により求めた。

〔結果〕得られた結果を図6に示す。尚、図6は横軸の各界面活性剤濃度(β-グルカン添加溶液中の濃度。0.009w/v%のP x Bを含む。)に対して得られたβ-グルカン回収率の値を縦軸に沿ってプロットした点を結んだものである。図6の結果から明らかな如く、界面活性剤濃度を上げてβ-グルカン回収率は約90%と一定の値を示した。このことから、この濃度範囲であれば界面活性剤(ポリオキシエチレングリコール p-t-オクチルフェニルエーテル)は、AL溶液とβ-グルカンとの反応を阻害も促進もしないと判断される。

【0052】実施例 10.

〔試薬〕ET溶液、AL溶液、界面活性剤水溶液及びP x B水溶液は、実施例1と同じものを使用した。

〔操作法〕所定濃度のET溶液100 μlを、蒸留水、0.2

w/v%の界面活性剤(ポリオキシエチレングリコール p-t-オクチルフェニルエーテル)水溶液、0.002~0.01w/v%のP x B水溶液又は0.002~0.01w/v%のP x Bを含む0.2w/v%の界面活性剤(ポリオキシエチレングリコール p-t-オクチルフェニルエーテル)水溶液900 μlで10倍希釈しET添加溶液とした(ETの終濃度は2 ng/ml。また、ET添加溶液中のP x Bの濃度は0.0018~0.009w/v%、界面活性剤の濃度は0.18w/v%)。得られたET添加溶液中のET濃度を、実施例1と同様の操作法により求めた。

〔結果〕得られた結果を図7に示す。尚、図7は横軸のET添加溶液中の各P x B濃度に対して得られた該溶液のゲル化時間(Tg)を縦軸に沿ってプロットした点を結んだものである。図中、—△—は各種濃度のP x B水溶液を用いて調製したET添加溶液について得られた結果を、—□—は0.2w/v%の界面活性剤を含むP x B水溶液を用いて調製したET添加溶液について得られた結果を夫々示す。図7の結果から明らかな如く、ET添加溶液中のE. coli 055:B5 LPSのET活性は、界面活性剤とP x Bとを共存させることにより、完全に阻害されることが判る。

【0053】実施例 11.

〔試薬〕AL溶液、界面活性剤水溶液及びP x B水溶液は、実施例1と同じものを使用した。ET溶液は、実施例8と同じものを使用した。また、β-グルカン溶液は、実施例9と同じものを使用した。

〔操作法〕ヘパリン処理した正常人血漿1.0 mlに、4 μg/mlのET溶液10 μlと200 ng/mlのβ-グルカン溶液10 μlとを添加し、得られたET及びβ-グルカン添加血漿100 μlを、注射用蒸留水、0.2w/v%の界面活性剤(ポリオキシエチレングリコール p-t-オクチルフェニルエーテル)水溶液、0.01w/v%のP x B水溶液又は0.01w/v%のP x Bを含む0.2w/v%の界面活性剤(ポリオキシエチレングリコール p-t-オクチルフェニルエーテル)水溶液900 μlで10倍希釈し、80℃で5分間加熱処理したものを、直ちに氷冷した(ETの終濃度は3.92 ng/ml、また、β-グルカンの終濃度は196pg/ml)。得られた希釈血漿中のβ

-グルカン濃度を、実施例6と同様の操作法により求めた。また、上記で用いたのと同じ血漿に、注射用蒸留水10  $\mu$ lと20ng/mlの $\beta$ -グルカン溶液10  $\mu$ lとを添加したものについても上記と同様の操作を行い、 $\beta$ -グルカン濃度を求めた。更に、これらの結果に基づいて更に $\beta$ -

\* グルカンの回収率を算出した。  
 【結果】得られた結果を表7に示す。  
 【0054】  
 【表7】

表7

| 希釈溶液                         | $\beta$ -グルカン回収率(%) |          |
|------------------------------|---------------------|----------|
|                              | E T添加血漿             | E T無添加血漿 |
| 注射用蒸留水                       | 54200               | 107      |
| 0.2% 界面活性剤水溶液                | 3540                | 98       |
| 0.01% P x B水溶液               | 893                 | 105      |
| 0.01% P x B水溶液(0.2%の界面活性剤含有) | 117                 | 112      |

【0055】表7の結果から明らかな如く、界面活性剤とP x Bとを $\beta$ -グルカン測定時に共存させた場合にのみ、試料中に共存するE Tによる影響（測定値に正誤差を与える影響）を受けることなく $\beta$ -グルカンの測定を実施し得ることが判る。

【0056】

【発明の効果】以上述べたことから明らかな如く、本発明は、試料中のE T活性を効果的に抑制する方法を提供するものであり、本発明の方法によれば、従来行われていた方法よりも簡便に且つ確実にE T活性の抑制を行うことができ、E T類縁物質の測定を、E Tの影響を受けることなく行うことができるという効果を奏するものであり、斯業に貢献するところ大なる発明である。

【0057】

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1に於いて得られた、血漿中のエンドトキシン（以下、E Tと略記する。）（E.coli 055:B5 LP S）測定に於ける界面活性剤濃度の影響を示すグラフである。

【図2】実施例1に於いて得られた、血漿中のE T（E.coli 055:B5 LPS）測定に於けるポリミキシンB（以下、P x Bと略記する。）濃度の影響を示すグラフである。

【図3】実施例4に於いて得られた、血漿中のE T（E.coli 0128:B12 LPS）測定に於ける界面活性剤濃度の影響を示すグラフである。

【図4】実施例4に於いて得られた、血漿中のE T（E.coli 0128:B12 LPS）測定に於けるP x B濃度の影響を示すグラフである。

【図5】実施例4に於いて得られた、界面活性剤存在下

の血漿中のE T（E.coli 0128:B12 LPS）測定に於けるP x B濃度の影響を示すグラフである。

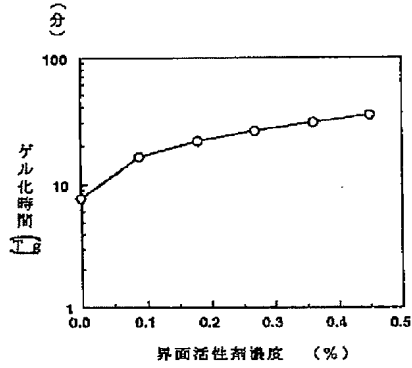
20 【図6】実施例9に於いて得られた、P x B存在下の $\beta$ -グルカン測定に於ける界面活性剤濃度の影響を示すグラフである。

【図7】実施例10に於いて得られた、E T（E.coli 055:B5 LPS）を含む水溶液測定に於けるP x B濃度の影響を示すグラフである。

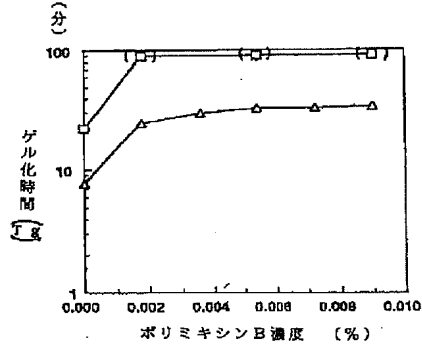
【符号の説明】

図2に於いて、 $\triangle$ はP x Bのみを含む水溶液を用いて得られた結果を、 $\square$ はP x Bと共に0.2w/v%の界面活性剤（ポリオキシエチレングリコール p-t-オクチルフェニルエーテル）を含む水溶液を用いて得られた結果（加熱処理時の界面活性剤濃度は0.18w/v%。）を夫々示す。また、 $\square$ は、T gが90分以上であったこと、言い換えればE Tが検出されなかったことを示す。図4に於いて、 $\circ$ は、T gが90分以上であったこと、言い換えればE Tが検出されなかったことを示す。図5に於いて、 $\square$ は0.1w/v%の界面活性剤を含有する水溶液を用いて（加熱処理時の界面活性剤濃度は0.09w/v%）得られた結果を、 $\times$ は0.2w/v%の界面活性剤を含有する水溶液を用いて（加熱処理時の界面活性剤濃度は0.18w/v%）得られた結果を夫々示す。また、 $\times$ 及び $\square$ は、T gが90分以上であったこと、言い換えればE Tが検出されなかったことを示す。図7に於いて、 $\triangle$ は各種濃度のP x B水溶液を用いて調製したE T添加溶液について得られた結果を、 $\square$ は0.2w/v%の界面活性剤を含むP x B水溶液を用いて調製したE T添加溶液について得られた結果を夫々示す。

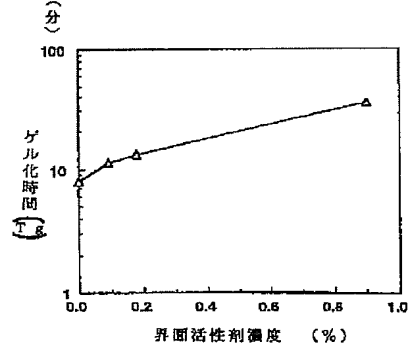
【図1】



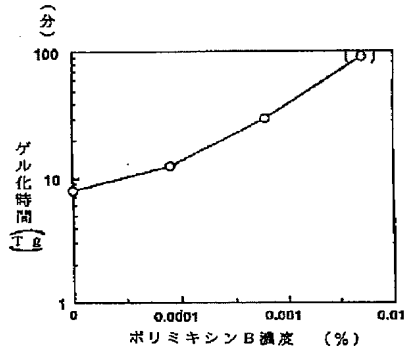
【図2】



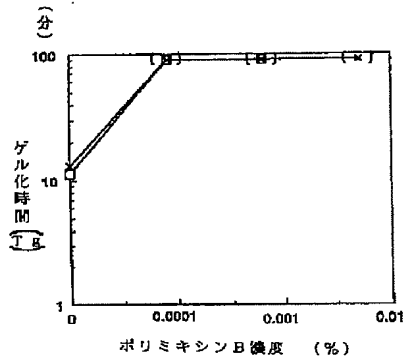
【図3】



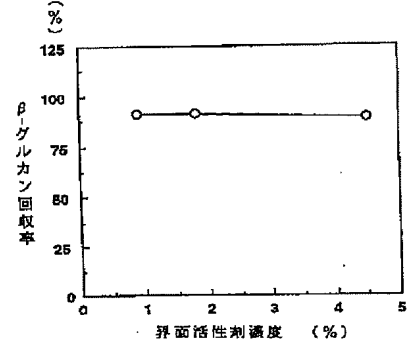
【図4】



【図5】



【図6】



【図7】

